

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004272

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-061273
Filing date: 04 March 2004 (04.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 6 1 2 7 3

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 0 6 1 2 7 3

出 願 人
Applicant(s):

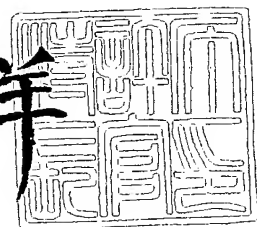
独立行政法人理化学研究所

2 0 0 5 年 4 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 RJH15-213
【提出日】 平成16年 3月 4日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 1/16
C12Q 1/02

【発明者】
【住所又は居所】 東京都目黒区平町 1 - 2 1 - 2 0 - 6 0 6
【氏名】 工藤 俊章

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市岡 1 - 2 - 3 4 - 2 0 1
【氏名】 本山 高幸

【特許出願人】
【識別番号】 503359821
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316227

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

糸状菌の0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子で形質転換した酵母。

【請求項 2】

糸状菌の0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子が、HIK1遺伝子である請求項 1 記載の形質転換酵母。

【請求項 3】

酵母が³出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である請求項 1 又は 2 項記載の形質転換酵母。

【請求項 4】

(1) 糸状菌由来の0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで形質転換した酵母及び (2) コントロール酵母 (糸状菌特異的酵素を発現しない酵母) を含む糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。

【請求項 5】

糸状菌由来の0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子がHIK1遺伝子である請求項 4 記載の糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。

【請求項 6】

酵母が³出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である請求項 4 又は 5 記載の糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。

【請求項 7】

以下の (1) から (3) の工程を含む糸状菌特異的農薬候補又は糸状菌特異的医薬候補のスクリーニング方法。

(1) 糸状菌由来0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子組み換え発現ベクターにより酵母を形質転換した形質転換体及びコントロール酵母 (0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼを発現しない酵母) に農薬候補試料又は医薬候補試料を投与する工程

(2) 農薬候補試料又は医薬候補試料を投与された上記0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母を一定時間培養する工程、及び

(3) 一定時間培養後、0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数を計測する工程。

【請求項 8】

形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数の計測を、0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の培養液のODを計測することにより行う請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数の計測を酵母特異的抗体を用いて行う請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

糸状菌由来0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子がHIK1遺伝子である請求項 7 から 9 いずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 11】

酵母が³出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である請求項 7 から 10 いずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】糸状菌特異的抗菌剤のスクリーニング方法及びそのためのキット

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願発明は、糸状菌特異的抗菌剤、例えば、糸状菌特異的農薬又は抗糸状菌医薬の新たなスクリーニング法に関する。より具体的には、本願発明は、糸状菌特異的酵素をターゲットとした薬剤をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

従来からの、農薬として有用な物質の探索を目的として行われる試験としては、実験室内での培地上で一次試験とすることが通常である。培地上での標的病害菌に対するこのような試験では、標的病害菌に対して効果がある様々な薬剤が全て引っかかってくる。そのため、非ターゲット生物に対しても殺菌性を示してしまう薬剤を拾ってしまう可能性が高い。

【0 0 0 3】

他方、作物体の一部又は温室内での植木鉢を用いた病害防除試験は、作物の育成、調製が欠かせず、費用及び労力を要するところ、現在新機能薬となる化合物は、供試化合物の1万分の1程度といわれており（非特許文献1；）、非常に多数の供試化合物の検査には、不適切であった。

【0 0 0 4】

さらに、このような方法では、植物体、人体への副作用などについては、十分検討できないものであった。

【0 0 0 5】

たとえば、有機水銀剤は、イネいもち病の重要な防除剤として使用されてきたが、動物への毒性に鑑み、使用が中断されている。

【0 0 0 6】

また、農薬の植物毒性を簡便に調査する方法としては、植物培養細胞を用いる方法が提案されている（特許文献1：特開平5-294995）。さらに、特許文献2（特開平9-124411）では、いもち病害防除剤のためのファイアトレキシンのスクリーニングを、試験試料をイネの葉先端に滴下施用後、1週間後に、葉を裁断し抽出してファイアトレキシンの生成の有無をHPLCで確認する方法が記載されている。

【0 0 0 7】

一方、各種糸状菌病に有効な農薬として知られているフェニルピロールphenylpyrroles、ジカルボキシイミドdicarboximides、芳香族炭化水素aromatic hydrocarbonsの薬剤の作用点の解析から（非特許文献2-7：Pillonel and Meyer, 1997; Zhang et al., 1999; Fujimura et al., 2000; Ochiai et al., 2001; Ochiai et al., 2002; Oshima et al., 2002）、多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ（Os-1サブファミリー）であることが解明されつつある。

医薬のスクリーニングについても同様の問題が存在している。

【0 0 0 8】

【特許文献1】特開平5-294995

【特許文献2】特開平9-124411

【非特許文献1】植物病理学事典 養賢堂 1995年3月30日、P.783-784

【非特許文献2】Pillonel, C., and Meyer, T. 1997. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic. Sci.* 49: 229-236

【非特許文献3】Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Yamada-Okabe, H. and Yamaguchi, I. 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Bi*

osci. Biotechnol. Biochem. 66: 2209-2215.

【非特許文献4】Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Xu, J.-R., and Lam, S. 1999. The hyper-osmotic stress response pathway of *Neurospora crassa* is the target of phenylpyrrole fungicides. Proc. 20th Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA, p. 72

【非特許文献5】Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. 2000. Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*. J. Pestic. Sci. 25: 31-36

【非特許文献6】Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. Pest Manag. Sci. 57:437-442.

【非特許文献7】Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. 2002. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 92, 75-80.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本願発明は、農薬候補又は医薬候補の効率的なスクリーニング方法を提供することを課題としている。具体的には、農薬については、植物体を用いることなく、しかも、植物など他の生物に弊害を及ぼすことのない農薬候補化合物を、効率的にスクリーニングすることを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本願発明者等は、植物病害を起こす病害菌に特異的に作用する農薬をスクリーニングする方法を鋭意研究した結果、植物病害菌にのみ存在する酵素又は該酵素が関与する情報伝達経路を標的とする農薬候補をスクリーニングすることで、植物病害菌を特異的に抑え、他の生物に影響をしない、農薬を探索できると考えた。

【0011】

そこで、糸状菌防除を例とし、糸状菌にのみ存在する酵素又は酵素を介する情報伝達系を利用できないか検討した。上述したように、糸状菌を防除するための農薬である三種のグループ（フェニルピロールphenylpyrroles、ジカルボキシイミドdicarboximides、芳香族炭化水素aromatic hydrocarbons）（図1）の薬剤の作用点の解析から、フェニルピロールに属するフルジオキシニルをはじめとする多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特異的ヒスチジinkinase（Os-1サブファミリー）を介した情報伝達系であることが明らかになりつつある。本発明者らは、まず、この情報伝達系を利用し、農薬候補スクリーニング方法及びキットを開発した。

【0012】

具体的には、本願発明者等は、これら糸状菌特異的酵素をコードする遺伝子発現ベクターで糸状菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない酵母を形質転換し、農薬候補試料をコントロール酵母（糸状菌特異的酵素を発現しない酵母）及び糸状菌特異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール酵母に副作用などの影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補試料を、農薬候補として選択するスクリーニング方法を開発することに成功し、本願発明を完成させたものである。

【0013】

なお、本スクリーニング方法は、医薬候補のスクリーニングにも同様に用いることがで

きる。

【発明の効果】

【0014】

本願発明により、従来の方法では不可能であった、糸状菌特異的酵素をターゲットとして糸状菌に特異的に作用する薬剤の候補を選択的に得ることが出来る。更に本願発明のスクリーニング方法及びキットでは、同じ菌類に属し、糸状菌に近縁である酵母をスクリーニングに用いているため、酵母にも作用する（副作用を起こす）薬剤を薬剤候補の選択と同時に除外することも可能であり、農薬及び医薬の開発を大幅に短縮できるという優れた効果を奏するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本願発明は、植物又は動物に病害を起こす病原糸状菌に特異的な酵素をコードする遺伝子発現ベクターで当該病害菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない他の微生物等の生物を形質転換し、農薬又は医薬の候補試料をコントロール微生物（同じ宿主由来で糸状菌特異的酵素を発現しないものなど）及び糸状菌特異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール微生物に副作用等の影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補又は医薬候補を選択するスクリーニング方法及びそのための形質転換体並びにそのためのキットを包含する。

【0016】

本願発明が対象とする病害菌には、糸状菌、例えば、植物病について言えばイネいもち病菌が、ヒトなどの動物病について言えば、カンジダ、アスペルギルス、水虫菌（白癬菌）等が包含される。糸状菌病害菌特異的酵素としては、糸状菌特異的ヒスチジinkinase（0s-1サブファミリー）が包含される。又、糸状菌を対象とする農薬又は医薬をスクリーニングする場合に置いては、糸状菌特異的酵素遺伝子を導入する宿主微生物としては、酵母、好適には出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を挙げることができる。

【0017】

さらに具体的には、本願発明には、糸状菌由来の糸状菌特異的ヒスチジinkinase遺伝子を発現する酵母（発現酵母）と発現しない酵母（非発現酵母）の組み合わせからなるキット、及び当該キットを用いる農薬候補スクリーニング方法が包含される。

【0018】

〔病害菌特異的薬剤とその標的酵素、植物病害を例として〕

現在までに、植物病害菌特異的農薬として、糸状菌特異的農薬が知られている。糸状菌特異的農薬としては、フェニルピロール(phenylpyrroles)としてフルジオキシニル (Fludioxonil) 及びフェンピクロニル (Fenpiclonil) が、ジカルボキシイミド (dicarboximides) としてイプロジオン(iprodione)及びビンクロゾリン(vinclozolin)が、並びに芳香族炭化水素(aromatic hydrocarbons)としてはクロロネブ(Chloroneb)及びPCNBが知られている。

【0019】

最近の研究により、上記した多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特異的ヒスチジinkinaseであることが、例えば、上記非特許文献2～7により解明されてきている。

【0020】

〔ヒスチジinkinase及びその情報伝達系〕

細胞内情報伝達には、シグナル蛋白質のセリン、スレオニン、アスパラギン酸、ヒスチジン及びチロシンの修飾を含む可逆的なリン酸化が関与している。ヒスチジinkinaseは、バクテリアから酵母、糸状菌、植物に存在する情報伝達因子の1つである。

【0021】

原核生物では、基本的な情報伝達因子として自己リン酸化ヒスチジinkinase及びそこからリン酸を受け取り下流に情報を伝えるレスポンスレギュレーターの二つの成分からなり2成分情報伝達システムである。

【0022】

真核生物のヒスチジンキナーゼは、ほとんどヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインをともに持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼである(図2)

(Ota, I. M., and Varshavsky, A. 1993. *Science* 262: 566-569.; Urao et al. 1999. *Plant Cell* 11: 1743-1754.; Pott et al., 2000 *Fungal Genet. Biol.* 31: 55-67.; Virginia et al., 2000 *Curr. Genet.* 37: 364-372.; West and Stock, 2001 *Trends Biochem. Sci.* 26: 369-376.)。

【0023】

真核生物型のヒスチジンキナーゼを介する情報伝達系は、ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ、含ヒスチジンリン酸転移タンパク質及びレスポンスレギュレーターの三成分からなる。

【0024】

ところでハイブリッド型ヒスチジンキナーゼの一つでアパカンカビから見出されたOs-1はN-末端側に92アミノ酸の繰り返し配列を6つ持つという特徴を持つ(図3)(Alex et al., 1996; Schumacher et al., 1997)。このような特徴を持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ(Os-1サブファミリー)はイネいもち病菌(*Pyricularia oryzae*: 完全世代名*Magnaporthe grisea*)や*Aspergillus nidulans*等の菌糸型生長を示す生物(糸状菌)からしか見つかっていない(Alex et al., 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 3416-3421.; Schumacher et al., 1997 *Curr. Microbiol.* 34: 340-347.; Alex et al., 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7069-7073.; Nagahashi et al., 1998 *Microbiology* 144: 425-432.)。

【0025】

【糸状菌特異的薬剤感受性酵母の調製】

nik-1/os-1遺伝子サブファミリーは、糸状菌でしか見つかっておらず、しかも、Nik-1/Os-1が糸状菌特異的薬剤の対象酵素であると考えられている。他方、糸状菌と同じく真核微生物である酵母においては、生物学的に近縁であるにもかかわらず、Nik-1/Os-1サブファミリーは存在しない。例えば、*S. cerevisiae*においては全ゲノム配列が決定されているが、ヒスチジンキナーゼは一つしか存在せず、Os-1サブファミリーのものとは異なる特徴を持つもの(Sln1, 図3参照)である(Sln1は、N末端側の6つのアミノ酸リピートを持たず、2つの膜貫通領域を持つ)。しかしながら、興味深いことに、糸状菌のOs-1サブファミリーの情報伝達系の下流因子は、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*でも多くが共通している(図4)(Maeda et al., 1995 *Science* 269: 554-558; Posas et al., 1996 *Cell* 86: 865-875.; Fujimura et al., 2003 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 186-191 (2003).)。

【0026】

そこで、os-1遺伝子サブファミリーに属する遺伝子をos-1遺伝子サブファミリー遺伝子を有しない酵母に導入して、糸状菌特異的薬剤感受性酵母を調製した。

【0027】

os-1遺伝子サブファミリーに属する遺伝子としては、例えば、イネいもち病菌のOs-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子HIK1 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number AB041647)、アカパンカビのOs-1サブファミリー遺伝子nik-1/os-1 (*Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 93, pp. 3416-3421)、*Botrytis cinerea*由来のものBcOS-1 (*Phytopathology*, 92, 75-80)、カンジダ酵母由来のものCOS1/CaNIK1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7069-7073)を挙げることができる。

【0028】

好適には、イネいもち病菌由来のHIK1及び配列番号16で示されるアミノ酸配列で表されるペプチド又は配列番号16で示されるアミノ酸配列に対して、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列で表されるペプチドであってヒスチジンキナーゼ活性(ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインが機能している)を有するポリペプチドをコードする遺伝子を挙げることができる。

【0029】

これら0s-1遺伝子を導入する生物体としては、微生物、植物培養細胞が挙げられ、好適には、0s-1の下流の情報伝達系（含ヒスチジンリン酸転移タンパク質、レスポンスレギュレーター、MAPKKK, MAPKK, MAPkinaseからなる情報伝達系）を備えた生物体が望ましい。具体的には、含ヒスチジンリン酸転移タンパク質としてYpd1、レスポンスレギュレーターとしてSsk1、MAP kinaseとしてHog1を内生的に有する微生物、好適には酵母、特に好適には出芽酵母、サッカロミセス属に属する微生物を挙げることができる。

【0030】

0s-1サブファミリーに属する遺伝子、例えばH1K1は、該遺伝子を導入する対象生物における、周知の発現ベクターに組み換えて、当該対象生物に導入することができる。例えば、酵母に導入するのであれば、pYES2、pYEp51、YEpl62、pBM150、pLGDS5、pAM82、pYE4、pAAh5、pMA56、pAH9/10/21、pMA230、pMA91、pG-1/2等を用いることができる。

【0031】

組み換えベクターの宿主生物（対象生物）への導入方法としては周知の手段を用いることができるが、例えば、酵母の形質転換は酢酸リチウム法（Ito et al., 1983 J Bacteriol. 153:163-168.）を用いることができる。

【0032】

[スクリーニング方法及びそのためのキット]

[I] 本発明の農薬候補又は医薬候補化合物スクリーニング用キットとしては、

(1) 0s-1サブファミリー遺伝子など糸状菌特異的遺伝子発現ベクターで酵母などの宿主生物を形質転換して調製された形質転換体および同じ宿主で糸状菌特異的遺伝子を発現しないコントロール生物を含むキット、

好適には、

(2) (1) 0s-1サブファミリー遺伝子発現ベクターで酵母を形質転換して調製された形質転換体および宿主酵母をベクターのみで形質転換して作成したコントロール酵母を含むキットが挙げられる。

【0033】

上記キットには、更に、以下で説明するスクリーニングに用いる計測用試薬などを含めることができる。

【0034】

[II] 本発明の農薬候補又は医薬候補化合物スクリーニング方法は、

(1) 0s-1サブファミリー遺伝子など糸状菌特異的遺伝子発現ベクターで酵母などの宿主生物を形質転換して調製された形質転換体および同じ宿主で糸状菌特異的遺伝子を発現しないコントロール生物に農薬候補試料又は医薬候補試料を投与する工程

(2) 農薬候補試料又は医薬候補試料を投与された上記糸状菌特異的遺伝子発現形質転換体及びコントロール生物を一定時間培養する工程、及び

(3) 一定時間培養後、糸状菌特異的遺伝子発現形質転換体及びコントロール生物の生存量（又は生存細胞数）を計測する工程を含んでいる。

【0035】

好適には、

(1) 0s-1サブファミリー遺伝子発現ベクターで酵母を形質転換して調製された形質転換体および宿主生物をベクターのみで形質転換して作成したコントロール酵母に農薬候補試料を投与する工程

(2) 農薬候補試料を投与された上記0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換体及びコントロール酵母を一定時間培養する工程、及び

(3) 一定時間培養後、0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖（又は生存細胞数）を計測する工程を含んでいる。

【0036】

以下具体的には、酵母を形質転換して用いる場合を例示して説明するが、他の微生物又は生物体であっても同様にスクリーニングなし得る。

【0037】

0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換酵母とコントロール酵母の増殖又は生存細胞数は、例えば、目視や、OD₆₀₀を測定することにより計測することもできるが、これ以外にも、酵母の酸素消費量を計測、培地中の糖濃度減少を計測する、蛍光又は発色酵素などの標識により酵母特異的標識抗体、又はビオチン等ラベルされた酵母特異的抗体を用いて計測する等、周知の適宜の方法で計測することができる。

【0038】

(i) プレート法

0s-1サブファミリー遺伝子発現ベクターで形質転換した形質転換体とコントロール酵母を適当な細胞数、例えば、10⁷細胞/ml、10⁶細胞/ml、10⁵細胞/ml、及び10⁴細胞/mlとなるように希釈し、1定量の農薬候補試料を含むプレート（例えば、90mmプレート）に、同じ量の細胞含有溶液（例えば、5 μ リットル）を滴下し、適宜な時間、例えば、5時間以上、300時間以下、好適には、48から72時間、培養温度は25° C-37° C、好適には、30° Cで培養し、プレートにおける0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換酵母とコントロール酵母の増殖状況を目視により確認し、コントロール酵母と0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換体で増殖状況（生存数）が異なった農薬候補試料又は医薬候補試料を、農薬候補又は医薬候補として選抜する。

【0039】

(ii) 液体培養法

0s-1サブファミリー遺伝子発現ベクターで形質転換した形質転換体とコントロール酵母をそれぞれ、8時間から10時間培養した後に、OD₆₀₀を測定する。次に、1定量の農薬候補試料又は医薬候補試料を含む培地に例えば、OD₆₀₀=0.01になるように加える。適温、例えば、27° Cで培養、好適には、振とう培養し、160 rpmで巡回振とうし、適宜の時間後から、一定時間間隔、好適にはコントロール酵母の倍加時間の \pm 50%時間の範囲内の一定時間間隔でOD₆₀₀を計測する。コントロール酵母としてATCC 201388にベクターpYES2を形質転換したものをを用いた場合には、例えば、3時間間隔でOD₆₀₀を計測する。この計測から、増殖曲線を作り、倍化時間を計算する。コントロール酵母に対し、0s-1サブファミリー遺伝子発現形質転換体で倍加時間に20%以上、好適には50%以上、更に好適には100以上の倍加時間の増加した農薬候補試料又は医薬候補試料を、農薬候補又は医薬候補として選抜する。

更に、次のような方法を採用することもできる。

【0040】

(iii). それぞれの酵母をプレーティングしたプレート上でペーパーディスクにしみこませて薬剤を投与し、30° C程度で静置培養し、目視等により生育阻止部分を評価する。

なお、従来よりfludioxonilとiprodioneについては、アカパンカビ (Ochiai et al., 2001. Pest Manag Sci. 57:437-442.) とイネいもち病菌以外にも、カンジダ症の病原菌 *Candida albicans* (Ochiai et al., 2002. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2209-2215.)、*Alternaria alternata* (Dry et al., 2004. Fungal Genet Biol. 41:102-108.) においては0s-1サブファミリーがターゲットであることが示唆されている。同様に、ある糸状菌由来の0s-1サブファミリーを標的として上記方法でスクリーニングされた農薬候補又は医薬候補は、通常、0s-1サブファミリーを有する他の糸状菌に対しても、農薬又は医薬候補として検討対象とすることができる。

【実施例】

【0041】

材料

使用した酵母菌株とプラスミドを以下の表1に示す。

【0042】

【表 1】

表 1 菌株とプラスミド

	genotype	origin
<u><i>S. cerevisiae</i> strain</u>		
ATCC201388	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC*
ATCC4002724	<i>hog1Δ</i> of ATCC201388	ATCC
ATCC4001561	<i>ssk1Δ</i> of ATCC201388	ATCC
ATCC4005271	<i>ste11Δ</i> of ATCC201388	ATCC
ATCC4000993	<i>slt2Δ</i> of ATCC201388	ATCC
cdc25H	<i>MATa ade2-101 his3-200 leu2-3 112 lys2-801 trp1-901 ura3-52 cdc25-2 Gal^r</i>	Stratagene
<u>plasmid</u>		
pYES2	2μm <i>URA3</i>	Invitrogen
pYES2-HIK1	<i>HIK1</i> in pYES2	this study
pYES2-hik1-H736V	<i>hik1-H736V</i> in pYES2	this study
pYES2-hik1-D1153E	<i>hik1-D1153E</i> in pYES2	this study
pCLA	<i>CEN LEU2</i>	this study
pCLA-SSK1	<i>SSK1</i> in pCLA	this study
pCLA-HOG1	<i>HOG1</i> in pCLA	this study
pSos	2μm <i>LEU2</i>	Stratagene
pSos-SSK1	<i>SSK1</i> in pSos	this study
pSos-YPD1	<i>YPD1</i> in pSos	this study
pMyr	2μm <i>URA3</i>	Stratagene
pMyr-HIK1	<i>HIK1</i> in pMyr	this study

*ATCC, American type culture collection

【0043】

薬剤は和光純薬から入手した。培地成分は特に断らない限りDifcoから購入したものを
用いた。なお、遺伝子操作は一般的方法を用いた (Sambrook et al., 1989 Molecular Cl
oning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold S
pring Harbor, NY.)。酵母の培養は特に断らない限り30°Cで行った。完全培地はYPD (1
% yeast extract、2% peptone、2% glucose) を用い、最小培地は選択に必要な栄養源を
抜いたSD (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% glucose、1X dropout solu
tion (Clontech)) あるいはSG (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% gal
actose、1% raffinose、1X dropout solution (Clontech)) を用いた。プレートを作る
場合は2%になるように寒天を加えた。イネいもち病菌P-2株のcDNAは以前報告した (Motoy
ama et al., 1998 Biosci. Biotech. Biochem. 62: 564-566.) のと同様にして作成した
。

【0044】

[実施例 1] 酵母での糸状菌のヒスチジinkinナーゼの発現と解析

(1) イネいもち病菌のOs-1サブファミリーヒスチジinkinナーゼ遺伝子HIK1 (DDBJ/EMB
L/GenBank accession number AB041647; 配列番号1) のcDNAを酵母用発現ベクターpYES2
のBamHI部位に挿入し、pYES2-HIK1を得た。pYES2-HIK1はGAL1 promoterの制御下でHik1の
全長をタグなしで発現できる。GAL1 promoterの発現抑制条件での培養はウラシルを抜い
たグルコースを炭素源とした合成培地 (SD/-Ura)、発現誘導条件での培養はウラシルを
抜いたガラクトースを炭素源とした合成培地 (SG/-Ura) で行った。酵母の形質転換は酢

酸リチウム法 (Ito et al., 1983 ibid) を用いた。

【0045】

薬剤感受性は、プレート上での培養と液体培養により解析した。プレートでの培養の場合、5ml SD/-Uraで一晩前培養し、集菌し、10ml SG/-Uraで洗浄し、10ml SG/-Uraで8時間から10時間培養した後に、OD₆₀₀を測定し、10⁷細胞/ml、10⁶細胞/ml、10⁵細胞/ml、10⁴細胞/mlに希釈し、各種薬剤を加えたSG/-Uraプレート上に5mlずつ滴下し、60時間から240時間培養した。液体培養の場合、5 ml SD/-Uraで一晩前培養し、集菌し、10 ml SG/-Uraで洗浄し、10 ml SG/-Uraで8時間から10時間培養した後に、OD₆₀₀を測定し、各種薬剤を含むSG/-Uraが50 ml 入った300 ml 三角フラスコにOD₆₀₀=0.01になるように加えた。27° C 160 rpmで旋回振とうし、12、15、18、21、24、33、36、39時間後にサンプリングし、OD₆₀₀を測定し、増殖曲線を作り、倍化時間を計算した。

【0046】

(結果)

0s-1サブファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子HIK1の酵母での発現による薬剤感受性の付与

ゲノム中に0s-1サブファミリーのヒスチジンキナーゼを持たない出芽酵母*S. cerevisiae*に、イネいもち病菌由来の0s-1サブファミリーのヒスチジンキナーゼHik1をpYES2-HIK1を導入することによりGAL1promoterの制御下で発現させた(図5A)。GAL1 promoterの発現誘導条件で、薬剤非存在下ではpYES2-HIK1形質転換体はpYES2形質転換体と同様の生育を示したが、本来感受性を示さない糸状菌特異的農薬(フルジオキシニル、イプロジオン、クロロネブ、図1参照)の存在下では、pYES2-HIK1形質転換体のみが生育阻害を示した(図5B)。フルジオキシニルに対する効果は5ppmで飽和し、イプロジオンに対する効果は25ppmで飽和し、クロロネブに対する効果は50ppmで飽和した。また、pYES2-HIK1形質転換体でもGAL1 promoterの発現抑制条件下では生育阻害を示さなかった(データ示さず)。なお、このような三種のグループの薬剤とは構造の違うシクロヘキシミドに対してはpYES2-HIK1形質転換体とpYES2形質転換体の間で発現誘導条件でも感受性の差は認められなかった。以上のように、pYES2-HIK1形質転換体でGAL1 promoterの発現誘導条件でのみ特異的に、3種の薬剤に対する感受性が付与されることから、この感受性は導入したHIK1によって特異的に引き起こされていると考えられる。

【0047】

同様の実験を液体培養で行った場合(表2)、pYES2形質転換体のGAL1 promoter発現誘導条件では薬剤の有無(0、25ppmフルジオキシニル、25ppmイプロジオン、25ppmクロロネブ)にかかわらず同様の生育速度を示し、倍化時間は2.2時間前後になった。pYES2-HIK1形質転換体では、薬剤の影響を受け、薬剤非存在下では倍化時間が2.19時間でpYES2形質転換体の場合とほとんど変わらなかったが、25ppmフルジオキシニル存在下では4.25時間、25ppmイプロジオン存在下では3.12時間、25ppmクロロネブ存在下では2.90時間、と明らかに生育速度の低下が認められた。

【0048】

【表2】

表2 イネいもち病菌の *HIK1* は出芽酵母に薬剤感受性を付与する

yeast strain	reagent	doubling time*
ATCC201388 [pYES2]	-	2.17±0.05
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Fludioxonil	2.25±0.06
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Iprodione	2.12±0.06
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Chloroneb	2.17±0.08
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	-	2.19±0.06
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Fludioxonil	4.25±0.20
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Iprodione	3.12±0.10
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Chloroneb	2.90±0.11

*average±standard deviation

【0049】

(2) 変異導入したHIK1は変異導入用合成DNA (HK-H736V: 5' -CCTCGCTAACATGTCCGTCGA AATCCGCACACC-3' (配列番号2), HK-D1153E: 5' -GATGTGATCCTGATGGAGGTTCAAATGCCTGTC ATG-3' (配列番号3)) を使用し、Mutan-Express Km kit (宝酒造) により作成した。それぞれの変異導入HIK1をpYES2のBamHI部位にクローニングすることにより、pYES2-hik1-H736VとpYES2-hik1-D1153Eを作成した。

【0050】

酵母の変異相補用のプラスミドpCLD-HOG1とpCLD-SSK1は、pCL1 (Clontech)をHindIII消化し自己連結して作成したpCLDのHindIII部位にATCC201388株由来のHOG1あるいはSSK1をクローニングすることにより作成した。HOG1は5' -TTTAAGCTTATCGATTGAAGGAAATAAGAGGAAT AGC-3' (配列番号4)と5' -TTTAAGCTTGGGTGAGACAGCTATTTAGCAAGTTC-3' (配列番号5)で増幅し、SSK1は5' -TTTAAGCTTCCCACTGCTGGATCGACCATTC-3' (配列番号6)と5' -TTTAA GCTTTAGTTGCCAGTCAAGATTTC-3' (配列番号7)で増幅した。なお、増幅した遺伝子に変異が入っていないことをDNA塩基配列決定により確認した。

【0051】

(結果) Hik1による薬剤感受性の付与にヒスチジンキナーゼの機能に必要とされるドメインが関わっているかどうかをみるため、ヒスチジンキナーゼドメインの機能に必要な自己リン酸化されるH736に変異を入れてこのドメインが機能しなくなるようにしたもの (Hik1-H736V) を発現させるためのプラスミドpYES2-hik1-H736Vと、レスポンスレギュレータードメインのリン酸リレーにおいてリン酸を受け取るD1153に変異を入れてこのドメインが機能しなくなるようにしたもの (Hik1-D1153E) を発現させるためのプラスミドpYES2-hik1-D1153Eを作成して同様にATCC201388株に導入した (図6A)。pYES2-HIK1を導入した株と異なり、pYES2-hik1-H736V導入株とpYES2-hik1-D1153E導入株はいずれも、3種の薬剤 (25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) にほとんど感受性を示さなくなり (図6B)、ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインの両方が薬剤感受性の付与に必要とされることが示唆された。なお、pYES2-hik1-H736V導入株では薬剤の有無にかかわらずやや生育阻害効果が認められた。また、浸透圧 (0.5M NaCl) 感受性には特に変化は認められなかった。

【0052】

[参考例1] Hik1による薬剤感受性の付与には酵母のHog1 MAPKを介する経路が必要である。

(1) 糸状菌において、Os-1サブファミリーヒスチジンキナーゼの下流には、出芽酵母のHog1 MAP kinaseのホモログ (アカパンカビの場合Os-2 (Zhang et al., 2002 Appl. Environ. Microbiol. 68:532-538.)) で、イネいもち病菌の場合Osm1 (Dixon et al., 1999

Plant Cell 11: 2045-2058.)) を介した情報伝達系が働いている (図4)。

【0053】

Hik1を出芽酵母で発現させて薬剤感受性が付与された結果の解釈として最も可能性が高いのが、Hik1に薬剤が作用して、出芽酵母のHog1 MAP kinaseに至る情報伝達系を攪乱して生育阻害を引き起こすというものである。この可能性を明らかにするため、この情報伝達系の因子の変異株であるhog1変異株とssk1変異株とstell1変異株を用いて、それぞれの変異株にpYES2-HIK1を導入して、発現を誘導した場合に薬剤感受性を示すかどうかをみた (図7A)。hog1変異株とssk1変異株では、pYES2-HIK1を導入して発現を誘導しても、薬剤 (25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) に対する感受性を示さなかった。一方、stell1変異株の場合は野生型株と同様に、pYES2-HIK1を導入して発現を誘導すると、薬剤 (25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) に対する感受性を示した。なお、pYES2導入株ではいずれの株も薬剤に対する感受性を示さなかったことから、ここでの薬剤感受性はHIK1特異的であることが示唆される。また、Hik1の発現は浸透圧 (0.5M NaCl) 感受性には影響を与えなかった。以上の結果から、Ssk1とHog1が薬剤感受性の付与に必要で、Stell1は必要でないことが示唆される。

【0054】

(2) この段階では、hog1変異株とssk1変異株でpYES2-HIK1を導入して発現を誘導しても、薬剤に対する感受性を示さなかったのは、hog1変異やssk1変異とは関係がない変異のためである可能性が否定できない。そこで、hog1変異株とssk1変異株にそれぞれ、無傷のHOG1遺伝子及びSSK1遺伝子を導入した場合に薬剤感受性が回復するかどうか、言い換えると、hog1変異やssk1変異が薬剤感受性を示さなくなった原因であるかどうかを明らかにするための実験を行った (図7B)。

【0055】

酵母の変異相補用のプラスミドpCLD-HOG1とpCLD-SSK1は、pCL1 (Clontech)をHindIII消化し自己連結して作成したpCLDのHindIII部位にATCC201388株由来のHOG1あるいはSSK1をクローニングすることにより作成した。HOG1は5' -TTTAAGCTTATCGATTGAAGGAAATAAGAGGAATAGC-3' (配列番号8) と5' -TTTAAGCTTGGGTGAGACAGCTATTTAGCAAGTTC-3' (配列番号9) で増幅し、SSK1は5' -TTTAAGCTTCCCACTGCTGGATCGACCATTTC-3' (配列番号10) と5' -TTTAAGCTTTAGTTGCCAGTCAAGATTTCCC-3' (配列番号11) で増幅した。なお、増幅した遺伝子に変異が入っていないことをDNA塩基配列決定により確認した。

【0056】

hog1変異株にpCLD-HOG1を導入しHOG1遺伝子を発現させた場合、薬剤に対する感受性が回復した。同様に、ssk1変異株にpCLD-SSK1を導入しHOG1遺伝子を発現させた場合も、薬剤に対する感受性が回復した。なお、ベクターのみ (pCLD) を導入したコントロールでは両変異株とも薬剤感受性の回復は認められなかった。

【0057】

以上の結果から、Hog1 MAPKを介した情報伝達系の因子の中で、Ssk1とHog1がHik1による薬剤感受性の付与に必要で、Stell1は必要でないことが示された。

【0058】

【参考例2】 Hik1とYpd1の相互作用の解析

CytoTrap XR library construction kit (Stratagene)を用いて、CytoTrap two-hybrid systemによるタンパク質間相互作用を解析した。このシステムは、一方のタンパク質をヒトSosとの融合蛋白として発現させるためのベクターpSosと、もう一方のタンパク質をミリスチン酸化シグナルとの融合タンパク質として発現させるためのベクターpMyrと、酵母におけるSosホモログCdc25の遺伝子に温度感受性変異が入った酵母株cdc25Hとからなる。二つのタンパク質の間で相互作用があるとヒトSosがミリスチン酸修飾部位により膜に移行し、酵母のcdc25変異を相補し、高温 (37度) でも生育できるようになる (図8A)。pMyr-HIK1はpMyrのSmaI部位にHIK1 cDNAをクローニングすることにより構築した。pSos-YPD1はSrfIとSalIで消化したpSosにSmaIとXhoIで消化したATCC201388株由来のYPD1を連結することにより構築した。pSos-Ssk1はSrfIとSalIで消化したpSosにSmaIとXhoIで消化したA

TCC201388株由来のSSK1を連結することにより構築した。YPD1は5'-TTTCCCGGATATGTCTAC TATCCCTCAGAAATC-3' (配列番号12)と5'-TTTCTCGAGTTATAGGTTTGTGTTGTAATATTTAGAT-3' (配列番号13)で増幅し、SSK1は5'-TTTCCCGGATATGCTCAATTCTGCGTTACTGTGG-3' (配列番号14)と5'-TTTCTCGAGTCACAATTCTATTTGAGTGGGCG-3' (配列番号15)で増幅した。なお、増幅した遺伝子に変異が入っていないことをDNA塩基配列決定により確認した。酵母の形質転換から、形質転換酵母の滴下までは、前述の薬剤感受性の解析の場合と同様に行った。ただし、滴下までの培養は全て25°Cで行い、滴下後は25°Cと37°Cで培養した。

【0059】

(結果)

Hik1は酵母のHog1の上流の情報伝達因子Ypd1と相互作用する

さらに、Hik1の酵母における作用点を明らかにするために、Hik1と酵母側の相互作用因子の候補Ypd1やSsk1との間の相互作用をyeast two-hybrid system (図8A、材料と方法参照)で解析した。本システムで用いる*S. cerevisiae* cdc25H株はCDC25遺伝子の温度感受性変異により高温(37°C)ではRas経路を活性化できないために生育できず、許容温度の25°Cでは生育できる。ターゲットをミリスリン酸化シグナルとの融合タンパク質、獲物(bait)をヒトSos(酵母のCdc25のホモログ)との融合タンパク質として発現させる。ターゲットと獲物との間に相互作用があるとミリスリン酸化シグナルによりヒトSosが細胞膜に移行し、Ras経路を活性化して37°Cでもcdc25H株が生育できるようになることにより、相互作用が検出できる。

【0060】

ここでは獲物をYpd1(pSos-YPD1で発現)とSsk1(pSos-SSK1で発現)にして、ターゲットのイネいもち病菌のHik1(pMyr-HIK1で発現)が結合するかどうかを解析した(図8B)。許容温度の25°Cでは全ての組み合わせで生育が認められた。ただし、相互作用を示すpositive controlの組み合わせ(pSos-MAFB + pMyr-MAFB)と相互作用を示さないnegative controlの組み合わせ(pSos-Coll + pMyr-MAFB)ではやや生育阻害が認められた。37°Cでは、positive controlの組み合わせでは生育が認められ、negative controlの組み合わせでは生育が認められず、実験系に問題がないことが示された。Hik1が相互作用を示したのはYpd1であり(pSos-YPD1 + pMyr-HIK1)、Ssk1とは相互作用を示さなかった(pSos-SSK1 + pMyr-HIK1)。なお、Ypd1のみでもわずかに37°Cでの生育が認められたが(pSos-YPD1 + pMyr)、これはYpd1の通常の酵母内での相互作用の相手である膜結合領域を持つSln1(図3、4)との相互作用によるものと考えられる。以上の結果から、出芽酵母内において、イネいもち病菌のHik1は出芽酵母のYpd1を介して薬剤感受性を付与している可能性が高いことが示された。

【産業上の利用可能性】

【0061】

本願発明は、農薬開発及び医薬開発の技術分野で利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】糸状菌を標的とした三種のグループの薬剤：薬剤の構造と、その薬剤が病原糸状菌防除に用いられる生物を示す。

【図2】バクテリア及び真核生物のヒスチジinkinナーゼの概念図。

【図3】Os-1サブファミリーのヒスチジinkinナーゼ及び出芽酵母のヒスチジinkinナーゼの概念図。

【図4】糸状菌と出芽酵母の情報伝達系の比較 出芽酵母とアカパンカビで共通と推定される部分を網掛けした。アカパンカビのタンパク質で括弧に入っているのは酵母のタンパク質と相同性はあるが相補性が確認されていないものである。

【図5】イネいもち病菌のHIK1を導入した出芽酵母の薬剤感受性試験結果：A. HIK1をGAL1プロモーターの制御下で発現させることができるプラスミドを酵母に導入して、発現誘導条件で各種薬剤への感受性をみた。：B. 各種薬剤を含む90mm径プレート

上に、プレートの上段にはpYES2-HIK1を導入した酵母細胞懸濁液、下段にはpYES2を導入した酵母細胞（コントロール）、それぞれを9mm間隔で（左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml）5mlずつ滴下後30° Cで60時間培養した。左プレートより、プレートごとに、S G培地のみ、FLudioxonil, Iprodine, Chloroneb, 又はCycloheximideが添加されている。薬剤濃度は、FLudioxonil, Iprodine, 及びChloronebについては、最上段のプレートが5ppm、2段目のプレートが25ppm, 更に、Iprodine及びChloronebについては、3段目が50ppm、4段目が100ppmである。Cycloheximideについては、0.25ppmで、240時間培養した。

【図6】HIK1による薬剤感受性とヒスチジinkinaseドメインとレスポンスレギュレータードメインの有無：A. ヒスチジinkinaseドメインが機能しないHik1-H736Vあるいはレスポンスレギュレータードメインが機能しないHik1-D1153Eを発現する酵母を作成した。：B. 各種薬剤を含む90mm径プレート上に、最上段にはpYES2を導入した酵母細胞懸濁液、上から2段目にはpYES2-HIK1を導入した酵母細胞懸濁液、上から3段目にはpYES2-hik1-H736Vを導入した酵母細胞懸濁液、最下段にはpYES2-hik1-D1153Eを導入した酵母細胞懸濁液それぞれを9mm間隔で（左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml）5mlずつ滴下後30° Cで72時間培養した。なお、各プレートには、左のプレートから順に、S G培地のみ、25ppm FLudioxonil、25ppm Iprodione、50ppm Chloroneb、又は0.5M NaClとなるように薬剤が含有されている。

【図7】HIK1による薬剤感受性とSSK1とHOG1の有無：A. ssk1変異株とhog1変異株ではHIK1を導入しても薬剤感受性を示さない。各種薬剤を含む90mm径プレート上に、上段から、順に、（最上段）コントロール酵母にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（2段目）hog1変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（3段目）ssk1変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（4段目）ste11変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（5段目）コントロール酵母にpYES2を導入した細胞懸濁液、（6段目）hog1変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（7段目）ssk1変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、又は（最下段）ste11変異株にpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液それぞれを9mm間隔で（左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml）5mlずつ滴下後30° Cで60時間（NaClのみ96時間）培養した。なお、左のプレートから順に、各プレートには、S G培地のみ、25ppm FLudioxonil、25ppm Iprodione、50ppm Chloroneb、又は0.5M NaClとなるように薬剤が含有されている。：B. ssk1変異株とhog1変異株にそれぞれSSK1とHOG1を導入するとHIK1存在下で薬剤感受性を示すようになった。各種薬剤を含む90mm径プレート上に、上段から順に、（最上段）hog1変異株にpCLD Δ -HOG1及びpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（2段目）hog1変異株にpCLD Δ 及びpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、（3段目）ssk1変異株にpCLD-SSK1及びpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液、又は（最下段）ssk1変異株にpCLD及びpYES2-HIK1を導入した細胞懸濁液それぞれを9mm間隔で（左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml）5ml滴下後30° Cで60時間（NaClのみ96時間）培養した。なお、左のプレートから順に、各プレートには、S G培地のみ、25ppm FLudioxonil、25ppm Iprodione、50ppm Chloroneb、又は0.5M NaClとなるように薬剤が含有されている。

【図8】イネいもち病菌のHik1と出芽酵母のYpd1との相互作用 A. CytoTrap two-hybrid systemの概要。ターゲットと餌（bait）の間で相互作用があるとhSosが細胞膜に移行しRasを活性化して、cdc25H株が37° Cでも生育できるようになる。ここでは、餌のYpd1あるいはSsk1にターゲットのHik1が「食いつくかどうか」をみた。 B. Hik1とYpd1の相互作用。細胞懸濁液（左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml）を5ml滴下後それぞれの温度で5日間培養した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Method for screening of filamentous fungus-specific antimicrobial agents and kit for the screening

<120> RIKEN

<130> RJH15-213

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5457

<212> DNA

<213> Magnaporthe grisea

<400> 1

```
taattttcca tccccctcgt gtcgccttcg cgcctactta ccgacttacc gcctttctcgc 60
tgattgagcc acggagagggc aattgggcctt gggggcgcta ttttttattt tcttattact 120
attctttttt tttgaatctt taccaacctt cttggctggg ttactttcct cgtctttaca 180
ctgcaacagt agcacgccat ccgaccagcg acaacaatct ccaaccctcc ccagagccac 240
ccaatcaacc aacaagcttg gttctccacg accacagcaa tcctttgatt ccctgtcgcg 300
cccgctaacc tcatgaattc ctaagccgac ctggatcaat ccaacgcctg cttcggtgtt 360
tagggcagct gccgactttt tttttcttct acatatatat tttcaaactg tcctatattt 420
gaccgtcggc cgagttccga caccgccac gcgcattcat gcggacgcgg cgactctggc 480
agctgtcgtc gcgattgtgg agaatatcgc taccaactcg gggggcccctg gaaaaaatgc 540
ttcatttcgc tccagtacct atgtccagct tcccgggtccg gaatccgacg agaagaaaca 600
gctcgagcgc gagcttgccg ccctgggtgat aagggtacag cagctcgaaa cccgtgccaa 660
cgcggtctct gctacaatat tccccgacac acccaacgaa actgcacatt cactctttgg 720
cgatgatagc tcgtccccta ccagttcgag ctcaggccgg gagcctaacc gactgaagtc 780
ggcatccagc acaacgagga atggtttcac tacggacggg cgtccatcaa agctcaacgc 840
aatcaccgat gaggagctcg aaggcttgcg cgaacatgtt gacggccagt cccggctgct 900
cgacagccaa agggccgagc tggacggcgt caatgcccaa ctcttgagc agaagcagct 960
gcaagagcgc gcccttgcca taatcgagca ggaacgtgta gccactttgg agagagagct 1020
atggaaacat caaaaggcca acgaggcctt ccagaaggct ctccgggaga ttggatcgat 1080
agtgaccgct gcagcccggg gtgacctctc taagagggtc aagataaacc cgattgagat 1140
ggaccctgaa atcaccacat tcaagaggac catgaacgcc atgatggatc aacttggcgt 1200
cttctctagt gaagtctcgc gagtggcaag agaggtcggc accgagggca tattaggttg 1260
acaggcccag atcgaggagg tggacggcac gtggaaagaa ctgacggaca atggtacggt 1320
cgaaacgtg ctcattcacct ctctatcca taactaccac cgcagatgct aacattgata 1380
ctttcatata gtcaacgtca tggcgagcaa cctgaccgac caagtccgcg aaatcgcttc 1440
agtcactaca gctgtggccc acggagattt gacccaaaag attgagagtg cggccaaggg 1500
agaaatccta cagcttcaac aaactataaa taccatggtg gaccaactac gcacatttgc 1560
ttcagagggt acccgtgtcg cccgtgacgt cggaaccgag ggaatgctcg gcgggcaggg 1620
```

tgacgttgaa ggggtcaagg gcatgtggaa tgagctgacg gtcaacgtca acgccatggc 1680
caacaattta acaacccaag tgcgcgacat catcaacgtt accacagccg tcgcaaaggg 1740
agatcttaca caaaaggtgc aggcggaatg tgcggcgag atttttgagc tcaagaacac 1800
gatcaattcc atggttgacc agctgcagca atttgctcgc gaggttacca agatcgccag 1860
agaggttggt accgaaggac ggctgggcgg ccaagcaact gttcacgatg tacagggaac 1920
ttggcgagat ctcacagaaa acgtgaacgg aatggctatg aatctcacca cacaagtacg 1980
agagatagcc aatgttacca gtgccgtcgc tgcaggcgac ctatccaaga agatcagggt 2040
agaggtcaag ggcgagattc tggacctcaa aaataccatc aacaccatgg ttgaccgcct 2100
cggaactttc gccttcgaag tcagcaaagt agcccgagcc gtccggcacag atggcactct 2160
tggttggtcag gctcaagttg agaattgtga gggcaaattg aaagacctca ccgaaaacgt 2220
caacaccatg gcgtcaaacc tcacttctca ggtaagcgga ctttatccac tggattggac 2280
tggtggcctt tcctctgaat tcagccctat tgtaaatcaa tgtatgcacc agtgtgcatg 2340
ttctgcaggg cctgctgtgt gtgcgtcgc agctgttttg gagacgttg gcgcatccc 2400
gcgtgcgctt gcattttgtc aaccaaattt gtctgcacat tgatgcatag cgagcacgtg 2460
ctaatttttg gccgggtctt ataggtcagg ggaatatcaa ccgtgacaca agccatcgcg 2520
aacggtgaca tgagccgaaa gatcgacgtg gaagccaagg gcgagatact aatcctcaag 2580
gaaactatca acaacatggt tgatcgtctg tcgatattct gcaatgaagt acaacgagtc 2640
gcaaaagatg taggcgttga tggcattatg gggggacaag ccgacgttgc aggtctcaag 2700
gggcgatgga aggagattac caccgatgtc aacaccatgg ccaacaatct tgtaagtgt 2760
ggaagatctc aaacaacggg aaactcaagc cagtgttaac ctaatccgca gacggcgcaa 2820
gtacgcgctt tcggagatat aaccaatgcc gctaccgacg gagacttcac caagctggtc 2880
gaggttgagg cgtcgggcga aatggacgaa ctgaagcgca agatcaatca aatggtctac 2940
aatctccgag acagtatcca aagaaacacg caagcaagag aagccgcaga attggccaac 3000
aagacgaagt cggagttcct cgctaacatg tcccacgaaa tccgcacacc catgaacggt 3060
atcatcggca tgacacaact tactcttgat acagatttga cgcaatacca acgcgaaatg 3120
ctcaacatig tcaacaatct cgccatgagt ctgctcacca ttatcgacga catcctcgat 3180
ctgtcaaaaga ttgaggctaa gcggatgggt atcgaggaga ttccatacac gttacgagga 3240
acggtcttca acgactgaa gactttggcg gtcaaggcga acgacaagtt tttggatctc 3300
acgtaccgtg tggacagctc agttcctgac cacgtcatcg gtgactcgtt ccgtctgcgc 3360
cagattatcc tgaacctggt tggcaatgcc atcaaattca ccgagcatgg agaggtcagc 3420
cttactatcc agaagggcaa cgacgtgacg tgcctgccaa acgagtacat gatcgaattt 3480
gtcgtgtcgg acacgggcat aggaattcca acggacaac tgggtctcat cttcgacaca 3540
ttccagcagg ctgatggatc catgacacgc aagtttggcg gaaccgggct tggctgtct 3600
atttccaaga ggctcgtcaa cctcatgggc ggtgacgtgt ggggtcaagtc acaatacggc 3660
aagggcagct cgttctactt cacttgtcgt gtccgcctcg ccgacgtgga tatctactc 3720
atcaggaagc agctgaagcc ttacaaggga caccaggtcc tgttcatcga taagggcaag 3780
actggacacg ggcccagagt ggggcagatg ctccggccagc tgggttttgt gcccatcgtg 3840
ctggaatccg agcaaaatca caccctgacg cgggtgcgcg gcaaggaatg tccctacgac 3900
gtgatagtig tcgactcaat cgacacagcc cggcgccctga gaggaattga cgacttcaag 3960
tatctgccca tcgttctcct ggcgccaact gtccacgtca gcctgaaatc ctgcttggac 4020
ttgggtatta cctcgtatat gacgatgcc tgcaagctca tcgacctcg caatggtatg 4080
gttcccgtc ttgagaaccg tgccacacca tcaatcatg acaacactaa gtcgttcgaa 4140
attctgtctg ccgaggacaa caccgtcaac cagcgcctgg ccgttaagat tcttgaaaag 4200
tacaaccacg ttgtgacggt agtcagcaac ggtgctgaag ctcttgaagc tgtcaaggat 4260
aacaataacg atgtgatcct gatggatgtt caaatgcctg tcatggtaag ttgatactcc 4320
ctcgtacata ttccatgatc ctccgttccc gacccgccag atagtctcga taagttccaa 4380
tactaatacgt ttgcaacatt aatagggttg atttgaggcg acggcaaaga ttcgtgaata 4440
cgagcgcagc ctgggcacac agaggacacc aatcatcgcg cttaccgctc acgcaatgat 4500
gggcgaccgt gagaagtgt tgcaggccca gatggacgag tacctgtcga agcctctgca 4560
gcagaaccac ttgatacaaa caattctcaa gtgtgcaacg ctgggtggcg ccttgttggga 4620

acaaaatcgt gagcgcgagc ttgaactagc aaggcatgcc gaacacaaag gaggactgtc 4680
 tacggaccg gcgagggcat cgtcggtaat gcgtccgcca ctacaccacc gaccggtgac 4740
 tacagccgag tcgctttctg gtggcgccga aagcccctcg ttgatggcaa atgacggcga 4800
 agatccaata caaagggcac gtagcagtct ctctgaacca ggatgcctat aaggctgaca 4860
 gctctggcct cctcgcactt gagggcgagc ctgaacattt gtagcttctc ttacgatcct 4920
 tgagcgcata gatcactgct gcctttttgt aacagccagc gcgatgacga tgttttcaac 4980
 agcctatact ttacctata ccacaaacgc atacgattat cccggtgtac ttctgtctat 5040
 tccctaggag tctgggaggt tacatittgt tctagtcatt aatgggtcga tggccaactg 5100
 gttttggcca caacgcatca aaaccaaacc agttctgtca tctactgacct tttgttccat 5160
 gtcggtaatg tcttcattaa tattgttact tttgcgggtc tgggtctgct tttacgatgg 5220
 atacatcggg ggaacaattt ctttcttctt gttttgttgg atatttgtgg tagtttctag 5280
 atatctgtcg aactacggga aggtgtggag agtgcattaa gaggcggcgc agttgttgtg 5340
 atcttgacac cccgagatga ccacagtcaa cccaatgaat aacacaaaat atacaactct 5400
 ctatgtcagt agaccaaata cgtattcgtt gtgttagtgt ttagcgcaag ggaaacc 5457

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 2

cctcgctaac atgtccgtcg aaatccgcac acc

33

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 3

gatgtgatcc tgatggaggt tcaaatgcct gtcattg

36

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 4

tttaagctta tcgattgaag gaaataagag gaatagc

37

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 5
tttaagcttg ggtgagacag ctatttagca agttc 35

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 6
tttaagcttc ccactgctgg atcgaccatt c 31

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 7
tttaagcttt agttgccagt caagatttcc c 31

<210> 8
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 8
tttaagctta tcgattgaag gaaataagag gaatagc 37

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 9
tttaagcttg ggtgagacag ctatttagca agttc 35

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 10
tttaagcttc ccactgctgg atcgaccatt c 31

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 11
tttaagcttt agttgccagt caagatttcc c 31

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 12
tttcccggga tatgtctact attccctcag aaatc 35

<210> 13
<211> 37

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 13
tttctcgagt tataggttg tgttgtaata tttagat 37

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 14
tttcccgga tatgctcaat tctgcgttac tgtgg 35

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 15
tttctcgagt cacaattcta tttgagtggg cg 32

<210> 16
<211> 1307
<212> PRT
<213> Magnaporthe grisea

<400> 16

Met	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Glu	Asn
1				5				10						15	

Ile	Ala	Thr	Asn	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Asn	Ala	Ser	Phe	Arg	Ser
			20					25					30		

Ser Thr Tyr Val Gln Leu Pro Gly Pro Glu Ser Asp Glu Lys Lys Gln
 35 40 45

Leu Glu Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Val Gln Gln Leu Glu
 50 55 60

Thr Arg Ala Asn Ala Ala Pro Ala Thr Ile Phe Pro Asp Thr Pro Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ala His Ser Leu Phe Gly Asp Asp Ser Ser Ser Pro Thr Ser
 85 90 95

Ser Ser Ser Gly Arg Glu Pro Lys Arg Leu Lys Ser Ala Ser Ser Thr
 100 105 110

Thr Arg Asn Gly Phe Thr Thr Asp Gly Arg Pro Ser Lys Leu Asn Ala
 115 120 125

Ile Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Leu Arg Glu His Val Asp Gly Gln
 130 135 140

Ser Arg Leu Leu Asp Ser Gln Arg Ala Glu Leu Asp Gly Val Asn Ala
 145 150 155 160

Gln Leu Leu Glu Gln Lys Gln Leu Gln Glu Arg Ala Leu Ala Ile Ile
 165 170 175

Glu Gln Glu Arg Val Ala Thr Leu Glu Arg Glu Leu Trp Lys His Gln
 180 185 190

Lys Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ser Ile
 195 200 205

Val Thr Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Arg Val Lys Ile Asn
 210 215 220

Pro Ile Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Thr Met Asn
 225 230 235 240

Ala Met Met Asp Gln Leu Gly Val Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg Val
245 250 255

Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ile
260 265 270

Glu Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn Val
275 280 285

Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val Thr
290 295 300

Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Ser Ala Ala
305 310 315 320

Lys Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val Asp
325 330 335

Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ser Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp Val
340 345 350

Gly Thr Glu Gly Met Leu Gly Gly Gln Ala Asp Val Glu Gly Val Lys
355 360 365

Gly Met Trp Asn Glu Leu Thr Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn Asn
370 375 380

Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ile Asn Val Thr Thr Ala Val Ala
385 390 395 400

Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Arg Gly Glu Ile
405 410 415

Phe Glu Leu Lys Asn Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln Gln
420 425 430

Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly
435 440 445

Arg Leu Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Gln Gly Thr Trp Arg
450 455 460

Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr Gln
465 470 475 480

Val Arg Glu Ile Ala Asn Val Thr Ser Ala Val Ala Ala Gly Asp Leu
485 490 495

Ser Lys Lys Ile Arg Val Glu Val Lys Gly Glu Ile Leu Asp Leu Lys
500 505 510

Asn Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Gly Thr Phe Ala Phe Glu
515 520 525

Val Ser Lys Val Ala Arg Ala Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly Gly
530 535 540

Gln Ala Gln Val Glu Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr Glu
545 550 555 560

Asn Val Asn Thr Met Ala Ser Asn Leu Thr Ser Gln Val Arg Gly Ile
565 570 575

Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Arg Lys Ile
580 585 590

Asp Val Glu Ala Lys Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile Asn
595 600 605

Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Cys Asn Glu Val Gln Arg Val
610 615 620

Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Gly Gly Gln Ala Asp Val
625 630 635 640

Ala Gly Leu Lys Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn Thr
645 650 655

Met Ala Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile Thr
660 665 670

Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Val Glu Val Glu Ala
675 680 685

Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val Tyr
690 695 700

Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Gln Ala Arg Glu Ala Ala
705 710 715 720

Glu Leu Ala Asn Lys Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser His
725 730 735

Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu Thr
740 745 750

Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile Val
755 760 765

Asn Asn Leu Ala Met Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu Asp
770 775 780

Leu Ser Lys Ile Glu Ala Lys Arg Met Val Ile Glu Glu Ile Pro Tyr
785 790 795 800

Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val Lys
805 810 815

Ala Asn Asp Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser Val
820 825 830

Pro Asp His Val Ile Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Ile Ile Leu
835 840 845

Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val Ser
850 855 860

Leu Thr Ile Gln Lys Gly Asn Asp Val Thr Cys Leu Pro Asn Glu Tyr
865 870 875 880

Met Ile Glu Phe Val Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Pro Thr Asp
885 890 895

Lys Leu Gly Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser Met
900 905 910

Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys Arg
915 920 925

Leu Val Asn Leu Met Gly Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr Gly
930 935 940

Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Arg Val Arg Leu Ala Asp Val
945 950 955 960

Asp Ile Ser Leu Ile Arg Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Lys Gly His Gln
965 970 975

Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Lys Thr Gly His Gly Pro Glu Val Gly
980 985 990

Gln Met Leu Gly Gln Leu Gly Leu Val Pro Ile Val Leu Glu Ser Glu
995 1000 1005

Gln Asn His Thr Leu Thr Arg Val Arg Gly Lys Glu Cys Pro Tyr
1010 1015 1020

Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Arg
1025 1030 1035

Gly Ile Asp Asp Phe Lys Tyr Leu Pro Ile Val Leu Leu Ala Pro
1040 1045 1050

Thr Val His Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Leu Gly Ile Thr
1055 1060 1065

Ser Tyr Met Thr Met Pro Cys Lys Leu Ile Asp Leu Gly Asn Gly
1070 1075 1080

Met Val Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp
1085 1090 1095

Asn Thr Lys Ser Phe Glu Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Thr Val
1100 1105 1110

Asn Gln Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr Asn His Val
1115 1120 1125

Val Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Glu Ala Leu Glu Ala Val Lys
1130 1135 1140

Asp Asn Lys Tyr Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Val
1145 1150 1155

Met Gly Gly Phe Glu Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg
1160 1165 1170

Ser Leu Gly Thr Gln Arg Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His
1175 1180 1185

Ala Met Met Gly Asp Arg Glu Lys Cys Ile Glu Ala Gln Met Asp
1190 1195 1200

Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Gln Gln Asn His Leu Ile Gln Thr
1205 1210 1215

Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Glu Gln Asn
1220 1225 1230

Arg Glu Arg Glu Leu Glu Leu Ala Arg His Ala Glu His Lys Gly
1235 1240 1245

Gly Leu Ser Thr Asp Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Met Arg Pro
1250 1255 1260

Pro Leu His His Arg Pro Val Thr Thr Ala Glu Ser Leu Ser Gly
1265 1270 1275

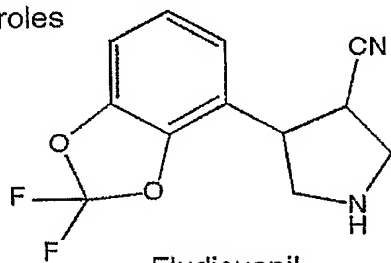
Gly Ala Glu Ser Pro Ser Leu Met Ala Asn Asp Gly Glu Asp Pro
1280 1285 1290

Ile Gln Arg Ala Arg Ser Ser Leu Ser Glu Pro Gly Cys Leu
1295 1300 1305

【書類名】図面

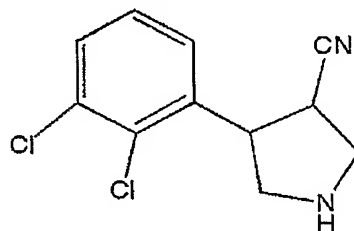
【図 1】

Phenylpyrroles



Fludioxonil

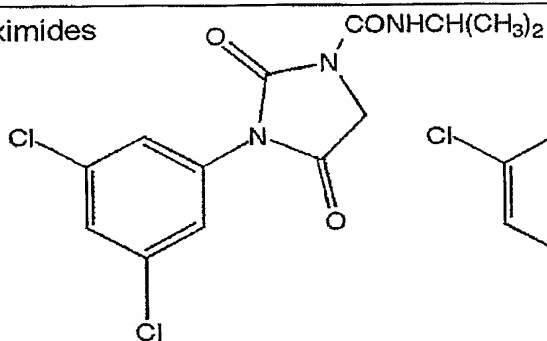
野菜類、果樹類



Fenpiclonil

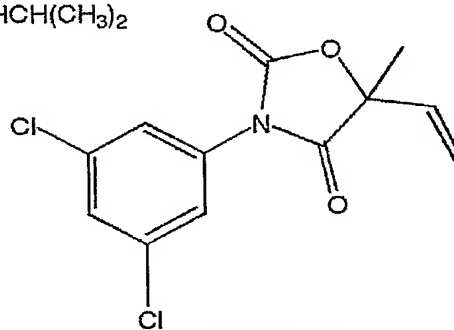
様々な植物の種子消毒

Dicarboximides



Iprodione

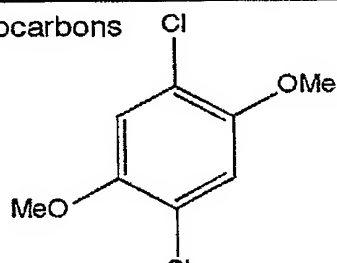
野菜類、果樹類、穀類



Vinclozolin

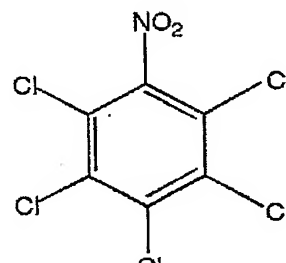
野菜類、果樹類

Aromatic hydrocarbons



Chloroneb

芝



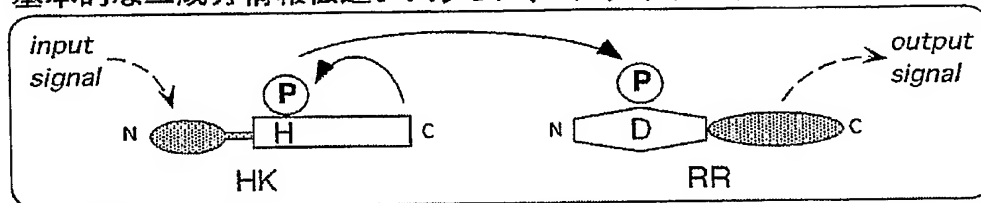
PCNB

野菜類

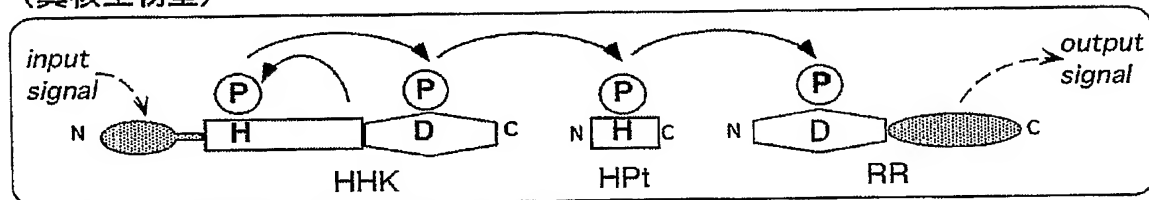
糸状菌をターゲットとした三種のグループの薬剤
 薬剤の構造と、その薬剤が病原糸状菌防除に用いられる生物を示す。

【図 2】

基本的な二成分情報伝達システム（バクテリア型）



ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼを利用した二成分情報伝達システム（真核生物型）



histidine kinase domain (HKD)

response regulator domain (RRD)

effector domain

HK: histidine kinase

RR: response regulator

HHK: hybrid-type histidine kinase

HPt: histidine containing phospho-transfer protein

バクテリア及び真核生物のヒスチジンキナーゼ

バクテリア型の二成分情報伝達系はヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの二成分からなる。

一方、真核生物型のヒスチジンキナーゼを介する情報伝達系は、ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼと含ヒスチジンリン酸転移タンパク質とレスポンスレギュレーターの三成分からなる。


【図 3】


Os-1サブファミリーの
ヒスチジンキナーゼ



出芽酵母の
ヒスチジンキナーゼ (Sln1)



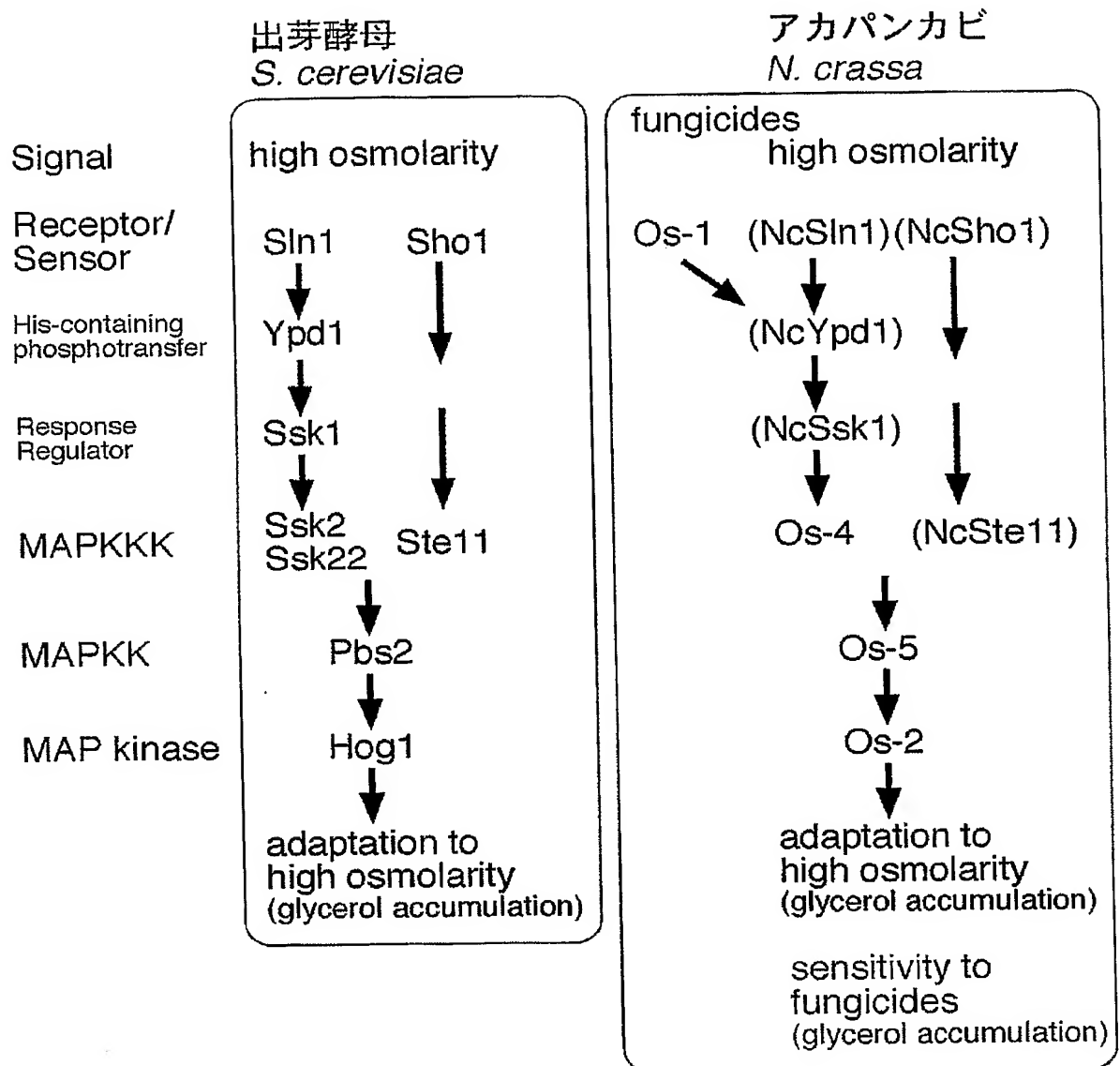
 histidine kinase domain

 response regulator domain

TMR: transmembrane region

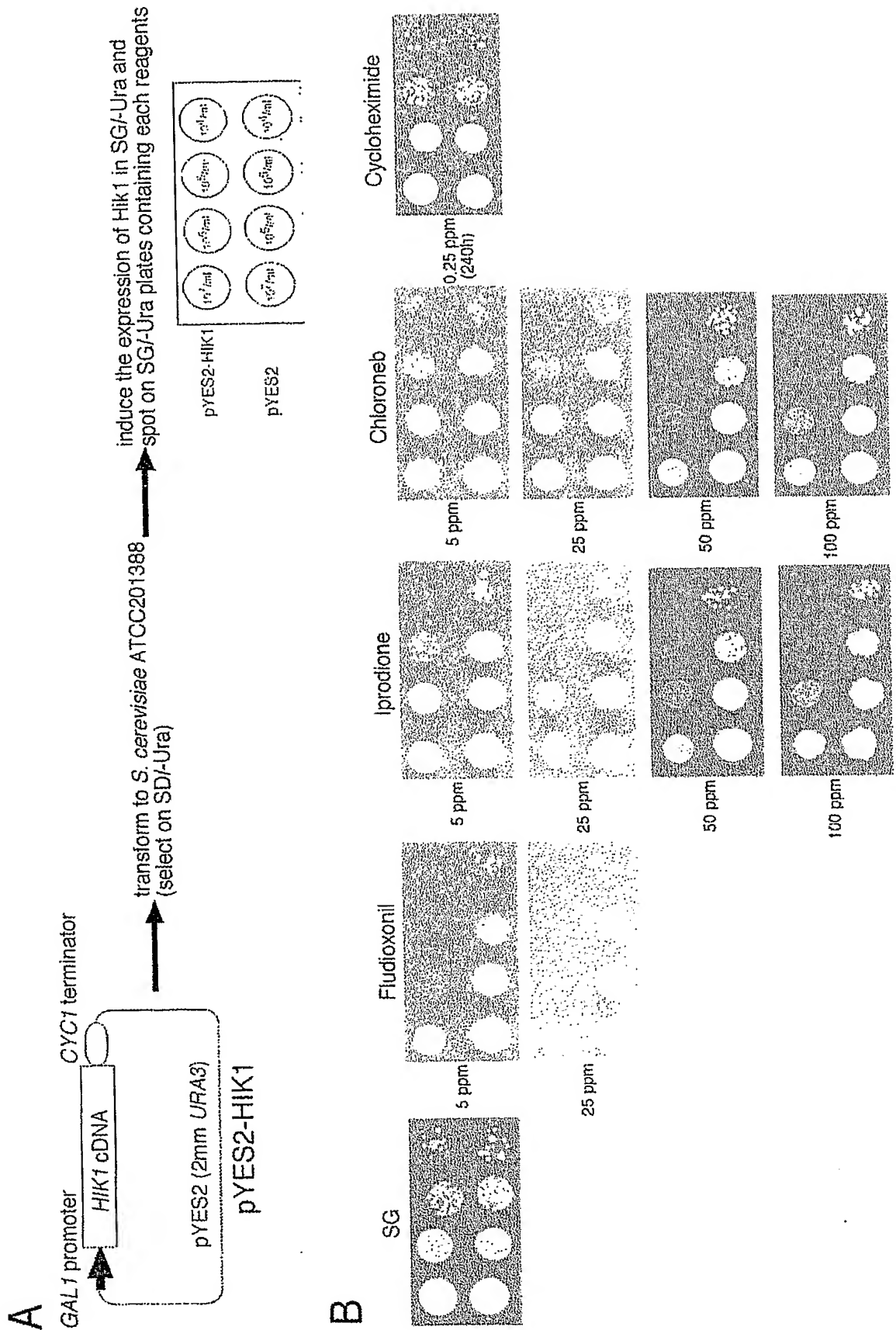
Os-1 サブファミリーのヒスチジンキナーゼと出芽酵母のヒスチジンキナーゼ

【図 4】

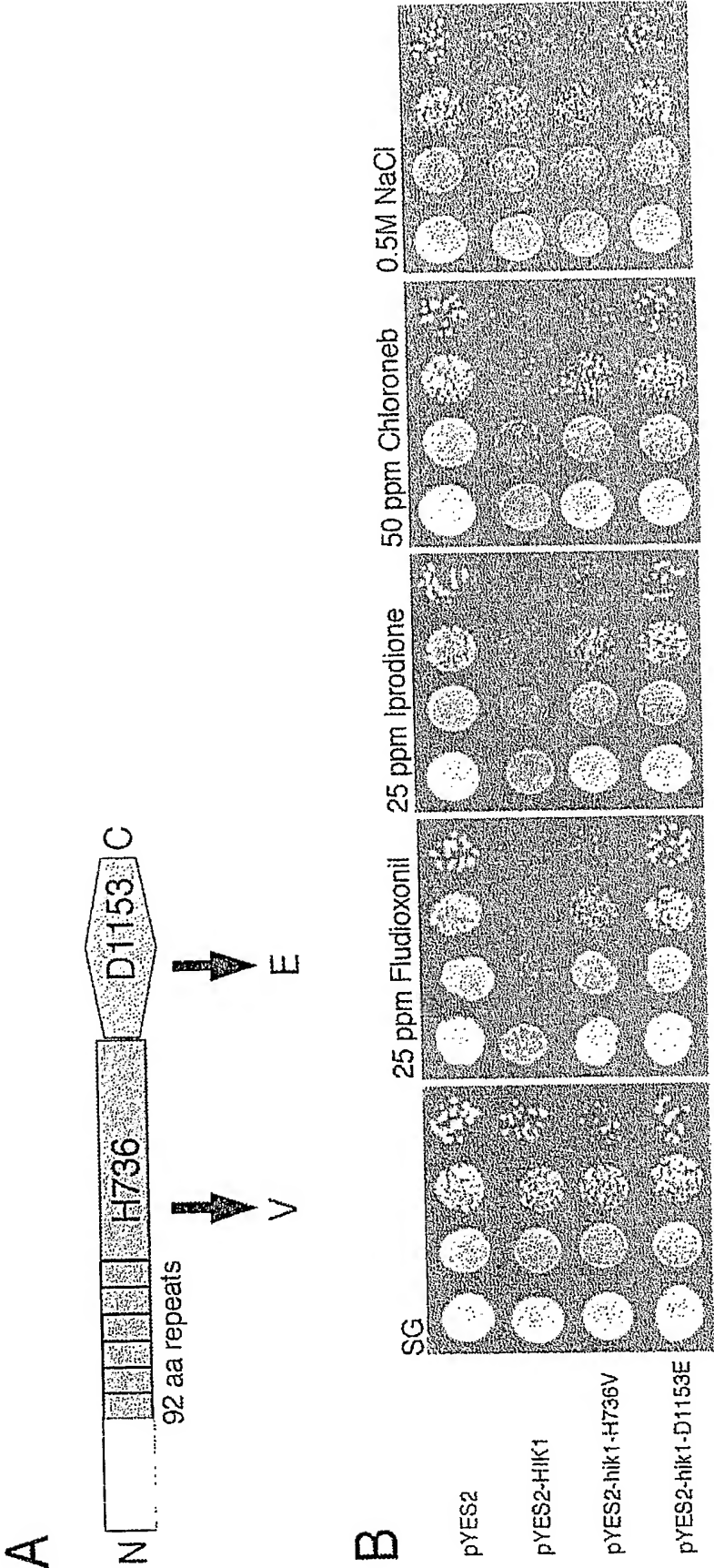


糸状菌と出芽酵母の情報伝達系の比較

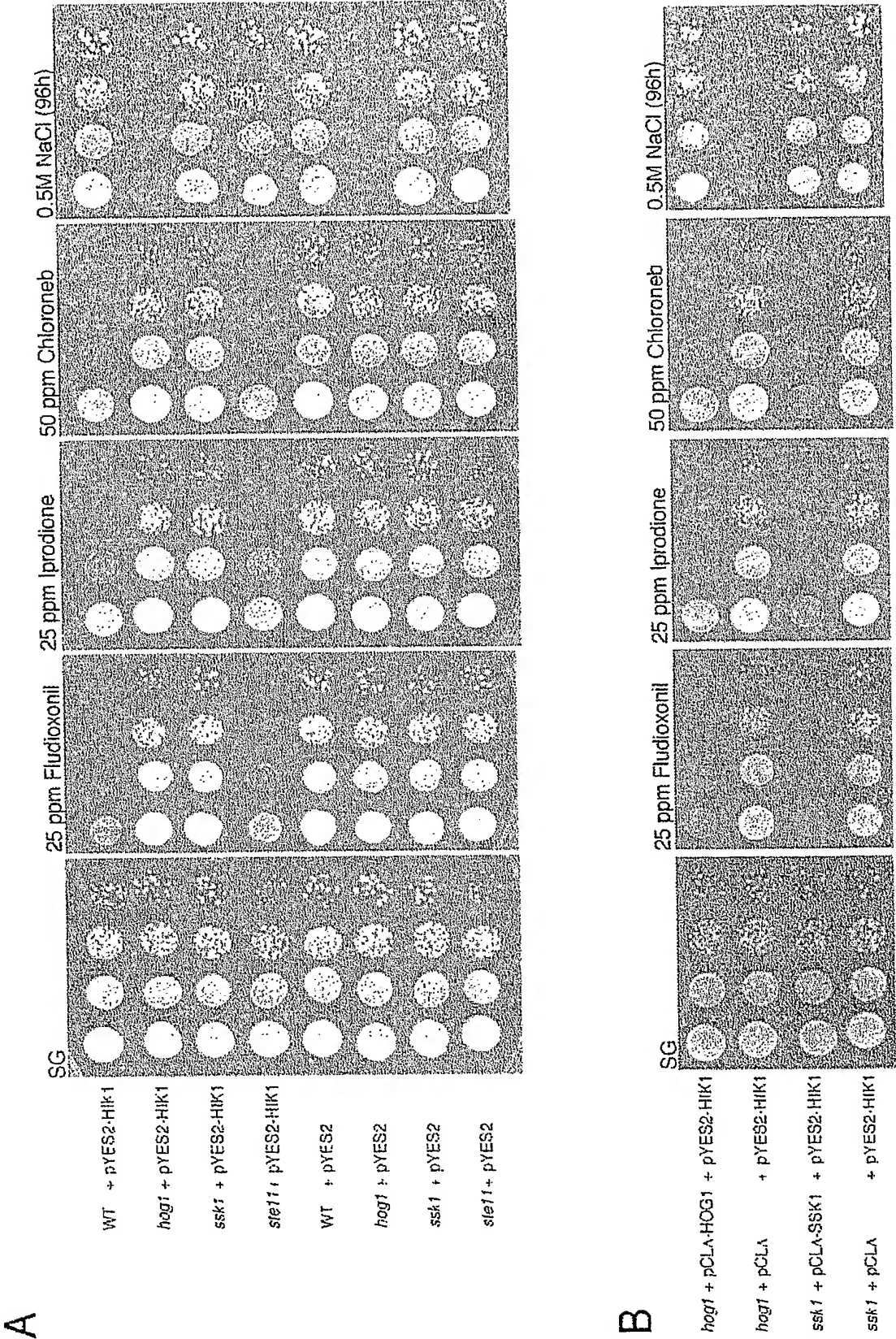
【図5】



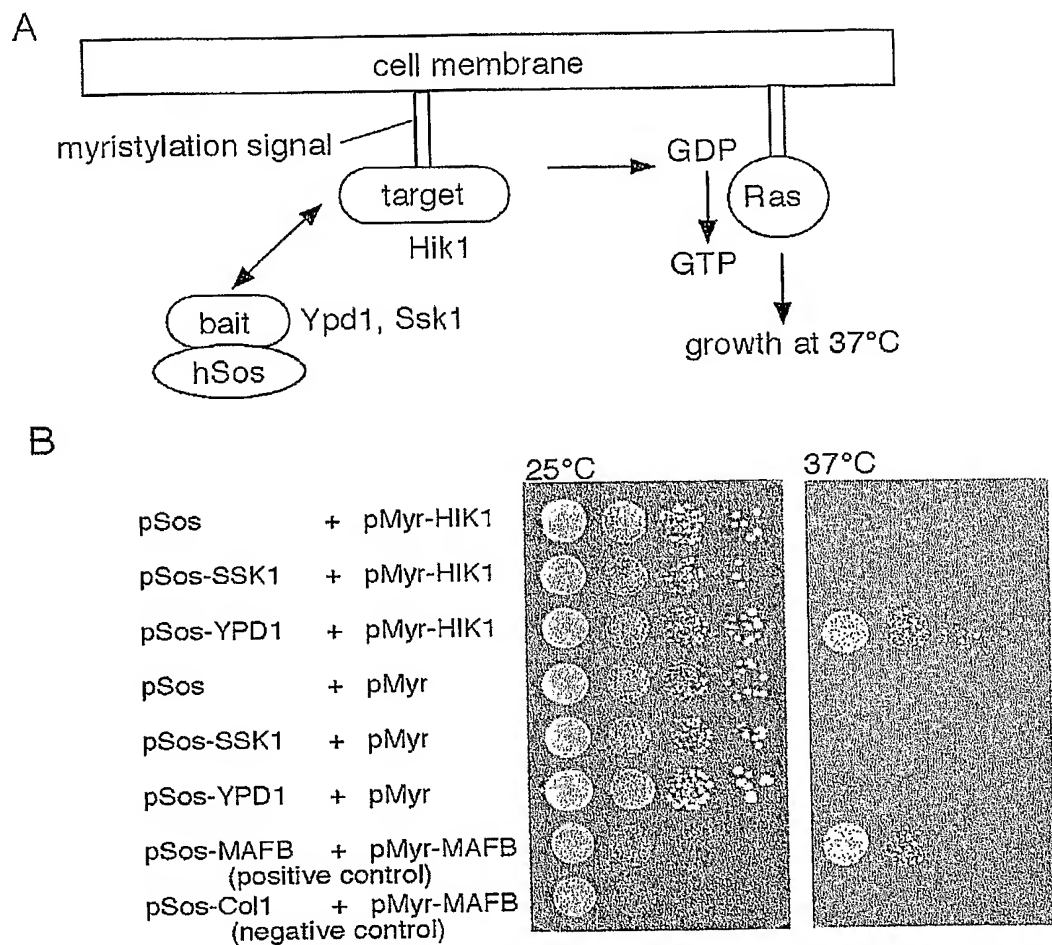
【図 6】



【図 7】



【図 8】



イネいもち病菌の Hik1 と出芽酵母の Ypd1 と相互作用

A. CytoTrap two-hybrid system の概要。ターゲットと餌 (bait) の間で相互作用があると hSos が細胞膜に移行し Ras を活性化して、cdc25H 株が 37°C でも生育できるようになる。ここでは、餌の Ypd1 あるいは Ssk1 にターゲットの Hik1 が「食いつくかどうか」をみた。

B. Hik1 と Ypd1 の相互作用。細胞懸濁液 (左から 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 /ml) を 5 μ l 滴下後それぞれの温度で 5 日間培養した。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本願発明は、農薬候補又は医薬候補の効率的なスクリーニング方法を提供することを課題としている。具体的には、農薬については、植物体を用いることなく、しかも、植物など他の生物に弊害を及ぼすことのない農薬候補化合物を、効率的にスクリーニングすることを課題としている。

【解決手段】 本願発明者等は、糸状菌特異的酵素をコードする遺伝子発現ベクターで糸状菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない酵母を形質転換し、農薬候補試料をコントロール酵母（糸状菌特異的酵素を発現しない酵母）及び糸状菌特異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール酵母に副作用などの影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補試料を、農薬候補として選択するスクリーニング方法を開発することに成功し、本願発明を完成させた。

なお、本スクリーニング方法は、医薬候補のスクリーニングにも同様に用いることができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 6 1 2 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 5 9 8 2 1]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏 名	独立行政法人理化学研究所